

METHOD FOR THE SIMULTANEOUS AMPLIFICATION OF MULTIPLE SEQUENCES IN A PCR RE MARKING THEREOF

Publication number: DE10065814
Publication date: 2002-07-11
Inventor: BERLIN KURT (DE); OLEK ALEXANDER (DE); DISTLER JUERGEN (DE)
Applicant: EPIGENOMICS AG (DE)
Classification:
- **international:** C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68
- **European:** C12Q1/68D4
Application number: DE20001065814 20001222
Priority number(s): DE20001065814 20001222

A

Ref

Abstract of DE10065814

A method for the amplification of nucleic acids is disclosed, whereby the section for amplification is first hybridised with at least two primer o two domains, of which the sequence-specific domain at the 3' terminus on the section to be amplified is hybridised and the generic domain : hybridised. Then an amplification reaction is carried out using a polymerase, a marked primer oligonucleotide is hybridised on the obtained : which binds to the generic domain of the first primer. In the final step the sequence of the amplification product is checked.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑯ Anmelder:
Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE

⑯ Vertreter:
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
10178 Berlin

⑯ Erfinder:
Berlin, Kurt, Dr., 14532 Stahnsdorf, DE; Olek,
Alexander, 10115 Berlin, DE; Distler, Jürgen, 10825
Berlin, DE

⑯ Entgegenhaltungen:
US 58 82 856 A
US 57 44 306 A
A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi Syndrome based on allelic methylation difference at the SNRPN Locus.
ZESCHNIGK, M. u.a., Eur. J. Hum. Genet. (1997)5, 94-98;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren für die simultane Amplifikation vieler Sequenzen in einer PCR-Reaktion und deren Markierung

⑯ Beschrieben wird ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, bei dem man zuerst die zu amplifizierenden Abschnitte mit mindestens zwei Primeroligonukleotiden hybridisiert, welche zwei Domänen aufweisen, von denen die am 3'-Ende befindliche, sequenzspezifische Domäne an den zu amplifizierenden Abschnitt hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche, generische Domäne nicht hybridisiert. Anschließend wird eine Amplifikationsreaktion mittels einer Polymerase durchgeführt und nachfolgend an die entstandenen Amplifikate ein markiertes Primeroligonukleotid hybridisiert, welches an die generische Domäne der ersten Primer bindet. Im letzten Schritt wird das Amplifikat hinsichtlich seiner Sequenz untersucht.

Beschreibung

Gebiet der Erfinlung

5 [0001] Die Erfindung bezieht sich auf die besonders rationelle Herstellung komplexer, markierter Amplifikate in einer PCR-Reaktion. Diese Amplifikate können nachfolgend hinsichtlich ihrer Sequenz mittels verschiedenster Methoden untersucht werden. Besonders ist das Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in DNA-Proben geeignet.

Stand der Technik

10

[0002] Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der im Prinzip jede DNA selektiv amplifiziert werden kann. Diese Methode beinhaltet den Gebrauch eines Satzes von meist zwei Oligonukleotiden mit vorbestimmter Sequenz, den sogenannten Primern, die an zu ihnen komplementäre DNA Strände hybridisieren und die Grenzen für die zu amplifizierende Sequenz definieren.

15

[0003] Die Oligonukleotide initiieren die DNA Synthese, die durch eine thermostabile DNA Polymerase katalysiert wird. Jede Runde der Synthese wird typischerweise durch einen Schmelz- und Reannelierungsschritt getrennt. Dies erlaubt es, eine gegebene DNA Sequenz mehrere hundert Male in weniger als einer Stunde zu amplifizieren.

[0004] Durch die Einfachheit und Reproduzierbarkeit dieser Reaktionen hat die PCR eine weite Akzeptanz erreicht. Zum Beispiel wird die PCR für die Diagnose ererbter Fehlfunktionen und bei Verdacht auf Erkrankungen verwendet.

20

[0005] Oft wird jedoch auch eine Amplifikation einer gegebenen Probe durchgeführt, einfach um das Material für eine nachfolgende Untersuchung zu vermehren. Die zu untersuchende Probe wird in diesem Fall zunächst amplifiziert, entweder ausgehend von genetischer DNA, oder z. B. isolierter mRNA. Meist ist es erforderlich, mindestens einen der Primer zu markieren, z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff, um das Fragment in nachfolgenden Experimenten identifizieren zu können.

25

[0006] Eine besonders einfache und kostengünstige Variante zum Anbringen einer Markierung an die Amplifikate stellt die Methode dar, Primer zu verwenden, die zwei Domänen haben. Die eine hybridisiert spezifisch an die zu amplifizierende Region, während die andere nur die Funktion hat, mit einem markierten Oligonukleotid zu hybridisieren. Dieses Oligonukleotid kann für verschiedenste Amplifikationen immer das gleiche sein, wenn immer die gleiche für die Markierung zuständige Domäne des Primers verwendet wird. Insbesondere bei teuren Markierungen ist dies eine kostengünstige Lösung. Beispielsweise werden für diese Reaktion drei verschiedene Oligonukleotide eingesetzt, ein sequenzspezifischer Vorwärtsprimer mit M13(-21) Schwanz, ein sequenzspezifischer reverser Primer und ein universelles fluoreszenzmarkiertes M13(-21) Oligonukleotid (Schuelke et al., An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments 2: 18, 2000), welches an den M13(-21) Schwanz des Vorwärtsprimers bindet.

30

[0007] Diese amplifizierte DNA wird für die Identifikation von Mutationen und Polymorphismen benutzt. Als analytische Methode dafür kommt z. B. die Primer Extension Reaktion, Sequenzierung nach Sanger oder z. B. Restriktionsverdau und nachfolgende Untersuchung auf z. B. Agarosegelen in Frage.

[0008] Zur Untersuchung der DNA wird über die Untersuchung der Basensequenz hinaus häufig das Verhältnis von den DNA-Basen Cytosin zu 5-Methylcytosin herangezogen, bzw. es werden einzelne Cytosinpositionen auf Methylierung hin untersucht.

40

[0009] 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

45

[0010] Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch "normale" molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15; 24(24): 5064-6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

50

[0011] Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15; 26(10): 2255-64.

55

[0012] Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (2. B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr; 5(2): 94-8) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und

entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The preimplantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet*. 1997 Nov; 17(3): 275-6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine "Primer-Extension-Reaktion" (Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res*. 1997 Jun 15; 25(12): 2529-31, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*. 1997 Jun 15; 25(12): 2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498). 5

[0013] Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

Grigg G, Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioessays*. 1994 Jun; 16(6): 431-6, 431; Zeschling M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet*. 1997 Mar; 6(3): 387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res*. 1994 Feb 25; 22(4): 695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene*. 1995 May 19; 157(1-2): 261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560. 10

[0014] Zur Analyse der PCR-Produkte müssen diese z. B. mit einer Fluoreszenz-Markierung oder radioaktiven Markierung versehen werden. Diese Markierungen können entweder an den Primern oder an den Nukleotiden angebracht werden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-Ende der jeweiligen Primer. Ferner kommen als Fluoreszenzfarbstoffe 6-Carboxyfluoreszin (FAM), Hexachlor-6-carboxyfluoreszin (HEX), 6-Carboxy-x-rhodamin (ROX) oder Tetrachlor-6-carboxyfluoreszin (TET) in Frage. Diese Farbstoffe sind jedoch vergleichsweise teuer. 15

[0015] Für die Analyse von Genen, wo das mutierte Allel oder der Polymorphismus gut charakterisiert sind, ist die Amplifikation von einzelnen definierten Regionen der DNA manchmal ausreichend. Wenn man jedoch undefinierte Gene analysiert, sind meistens eine Vielzahl von PCR Reaktionen notwendig, um kritische Deletionen oder Änderungen von Basen zu identifizieren. Noch komplizierter ist die Etablierung einer Multiplex-PCR, bei der ein Forwardprimer und eine Vielzahl von Reversprimern verwendet werden, um definierte Genabschnitte zu amplifizieren. 20

[0016] Während die Annelierungstemperatur und die Primerkonzentration bis zu einem gewissen Grad berechnet werden können, müssen die Bedingungen für jede einzelne Multiplexreaktion im allgemeinen experimentell bestimmt werden. Da die Wahrscheinlichkeit einer nichtspezifischen Initialreaktion mit jedem zusätzlichen Primer ansteigt, müssen die Bedingungen bei weiterer Primerzugabe meistens modifiziert werden. Des weiteren vermehren sich Artefakte, die durch die Konkurrenz um Ressourcen entstehen, z. B. um die Primer bei der Multiplex-PCR. Dies liegt daran, dass die Ausbeuten von ungleich amplifizierten Fragmenten mit jedem Zyklus ansteigen. 25

[0017] Durch die angesprochenen Schwierigkeiten kann die Entwicklung eines neuen diagnostischen Tests sehr arbeits- und kostenintensiv sein. 30

[0018] Weighardt et al. (PCR Methods and App. 3: 77, 1993) beschreiben den Gebrauch von 5'-verlängerten Oligonukleotiden für die PCR. Diese Amplifikationsmethode beinhaltet als charakteristisches Merkmal die separate Annelierung und Primer Verlängerungsreaktion für jeden individuellen Primer, was in einem Multiplex-Kontext nicht durchführbar ist. 35

[0019] Wie gezeigt, ist es gegenwärtig Stand der Technik, zur Identifizierung von Cytosin-Methylierung die Proben-DNA mit Bisulfit zu behandeln und nachfolgend einfache Amplifikationen durchzuführen. Es fehlt jedoch ein Verfahren, dass es erlaubt, unter Verwendung von Primer mit zwei Domänen eine besonders spezifische zwei-Stufen-Amplifikation durchzuführen, die besonders spezifisch eine Vielzahl von Fragmenten gleichzeitig bereitstellt und die zugleich das Problem löst, dass normalerweise eine Vielzahl von markierten und entsprechend teuren Primern für eine solche komplexe Amplifikation eingesetzt werden muss. 40

Aufgabenstellung

[0020] Es soll ein Verfahren bereitgestellt werden, welches die Nachteile des Standes der Technik überwindet. Es soll zum einen eine sehr spezifische 2 Stufen PCR mit hoher Multiplexierbarkeit bereitstellen, die zugleich das Problem der kostenintensiven Markierungen löst. Das Verfahren soll sich insbesondere zum Nachweis von Cytosinmethylierung in DNA-Proben eignen. 50

Beschreibung

55

[0021] Beschrieben wird ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren.

[0022] Die Nukleinsäuren werden besonders bevorzugt aus einer genomischen DNA-Frobe erhalten, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen. 60

[0023] Die Nukleinsäureprobe wird zu Beginn besonders bevorzugt in Agarose eingebettet und mit einer Bisulfatlösung (= Disulfat, Hydrogensulfat) umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt. Bei dieser chemischen Behandlung ist ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger vorhanden. 65

[0024] Da im humanen Genom lediglich ca. 3% der Cytosinbasen methyliert vorliegen, enthält Bisulfit-behandelte DNA zum größten Teil die Basen A, G, T und U; das heißt bezüglich ihres Basenpaarungsverhaltens lediglich 3 Basen (A, G und T), da U und T das gleiche Paarungsverhalten zeigen.

[0025] Dann werden die zu amplifizierenden Abschnitte mit mindestens zwei Primeroligonukleotiden hybridisiert, welche zwei Domänen aufweisen, von denen die am 3'-Ende befindliche, sequenzspezifische Domäne an den zu amplifizierenden Abschnitt hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche, generische Domäne nicht hybridisiert. Im nächsten Schritt wird eine erste Amplifikationsreaktion mittels einer Polymerase durchgeführt. In einem weiteren Schritt wird an die Amplifikate ein markiertes Primeroligonukleotid hybridisiert, welches an die generische Domäne der ersten Primer hybridisiert. Bevorzugt wird darauf eine zweite Amplifikation mit einer Polymerasereaktion durchgeführt.

[0026] Für die Amplifikation wird besonders bevorzugt eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.

[0027] Wird Bisulfit-behandelte DNA amplifiziert, führt dies dann zu DNA-Fragmenten, die sich dadurch auszeichnen, dass der (+)-Strang die Basenzusammensetzung A, T und G, sein revers-komplementärer (-)-Strang die Zusammensetzung A, T und C besitzt. Daraus ergibt sich, dass im (+)- oder (-)-Strang nie oder selten die C und G Nukleobasen gleichzeitig vorhanden sind. Durch diese Eigenschaft von Bisulfit-behandelter DNA und seinen Amplifikationsprodukten ist es möglich Primer herzustellen, die mit Bisulfit Templat-DNA keine unspezifischen PCR-Produkte ergeben und so als generell anwendbare Markierungsoligonukleotide bzw. Detektionssonden für PCR-Amplifikate von Bisulfit-behandelter DNA verwendet werden können.

[0028] Voraussetzung hierfür ist, dass für die Amplifikation von Bisulfit-behandelter DNA genspezifische Primer des Typs 1 und 2 entworfen werden, die neben einer Gen-spezifischen Domäne eine generische Domäne besitzen. Diese generische Primerdomäne ermöglicht die Markierung der DNA-Fragmente mit den generell anwendbaren Markierungsoligonukleotiden (Typ M1 und Typ M2) bzw. ihre Detektion mit den generellen Markierungsoligonukleotiden (Typ M1 und Typ M2) durch Hybridisierungsverfahren. Für die Amplifikation spezifischer Gene oder mehrerer Gene in einer Multiplex-PCR sind mindestens 2 Primer notwendig, ein Primer des Typs 1 und der zweite vom Typ 2 (siehe unten). Mit diesen Primern werden die entsprechenden DNA-Fragmente amplifiziert.

Aufbau und Eigenschaften der Primer

Primer TypM1
45 Sequenz identisch mit generischer Domäne des Typ1 Primers
Mod-5'-----3'
enthält A,T,C,G, Mod: Modifikation oder Markierung

Primer TypM2
Sequenz identisch mit reverskomplimentärer Sequenz der generischen Domäne des Typ2 Primers
55 Mod-5'-----3'
enthält A,T,C,G, Mod: Modifikation oder Markierung

60 [0029] Bevorzugt enthält die generische Domäne der Primer des Typs 1 und 2 eine Sequenz, die aus A, C, G und T zusammengesetzt ist.

[0030] Die genspezifischen Domänen sind, wie der Name schon sagt, spezifisch für ein oder mehrere Genfragment(e). Im Fall der sequenzspezifischen Primer vom Typ 1 ist die Sequenz aus A, T und G Basen, im Fall der sequenzspezifischen Primer des Typs 2 aus A, T und C Basen zusammengesetzt.

65 [0031] In einer zweiten PCR-Reaktion mit einem generischen Primerpaar des Typs M1 und M2 werden diese Gens oder eine beliebige Anzahl von Genen, die aus PCR-Reaktionen mit Primerpaaren (Typ 1 und Typ 2) hervorgegangen sind, gleichzeitig reamplifiziert, wobei alle Primer des Typs 1 und die Primer des Typs 2 identische generische Domänen besitzen (Beispiel 2 und 3). Die generischen Domänen der Primer des Typs 1 und 2 sind so entworfen, das die entspre-

chenden generischen Markierungsprimer (Typ M1 und Typ M2) mit der verwendeten Bisulfit Templat-DNA möglichst keine unspezifischen PCR-Produkte in eine PCR-Reaktion erzeugen. Die PCR-Reaktionen können sequentiell oder durch die geeignete Auswahl der Genspezifischen und generischen Primer, sowie die Durchführung der PCR, simultan in einer sogenannten Eintopf-Reaktion durchgeführt werden.

[0032] Generische Primer des Typs M1 und M2 können auch für die Detektion von PCR-Amplifikaten, die mit Primern des Typs 1 und Typs 2 erzeugt und z. B. auf DNA-Arrays, Nitrocellulose-, PVDF-Membranen oder anderen festen Oberflächen immobilisiert wurden, durch Hybridisierungsverfahren verwendet werden. 5

[0033] Die amplifizierten Abschnitte, die aus PCR-Fragmenten mit zwei Domänen aufweisenden Primern hervorgegangen sind, können auf Festphasen immobilisiert werden. Dies geschieht durch chemische Reaktionen (z. B. durch die Einführung einer 5'-Aminofunktion) oder durch Hybridisierung an andere auf die Festphase immobilisierte Oligonukleotide. Die Amplifikate können dabei die durch die markierten generischen Primer des Typs M1/M2 detektiert werden. Bevorzugt sind die an den Amplifikaten angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar. 10

[0034] Werden als generische Primer keine DNA-Oligomere jedoch PNA-Oligomere des Typs M1 und M22 verwendet, können PCR-Amplifikaten, die mit Primern des Typs 1 und Typs 2 erzeugt wurden, auch im MALDI-TOF identifiziert und quantifiziert werden. 15

[0035] Bei den Markierungen der Oligonukleotidprimer handelt es sich vorzugsweise um Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichem Emissionsspektrum (z. B. Cy3, Cy5, FAM, HEX, TET oder ROX) oder um Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen im Falle von Energietransfer-Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern. Die Markierungen können bevorzugt Radionuklide oder bevorzugt ablösbare Massenmarkierungen sein, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Vorzugsweise können auch zur Markierung Moleküle verwendet werden, die erst in einer weiteren chemischen Reaktion ein Signal erzeugen. Bevorzugt sind die zur Markierung verwendeten Moleküle an definierten Stellen an eine Festphase gebunden, um über eine Festphasen-PCR die PCR-Produkte zu immobilisieren, die aus einer PCR-Reaktion und Domäneprimern hervorgegangen sind. 20

[0036] Die PCR-Fragmente sind vorzugsweise auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet. 25

[0037] Abschließend wird das Amplifikat hinsichtlich seiner Sequenz untersucht.

[0038] Die beschriebene DNA-Modifizierung erfolgt durch den Einsatz von identischen Primerpaaren mit einer gleichen fragmentspezifischen Modifizierung, das heißt das alle Markierungen identisch sind und die gleiche spezifische Reaktion ergeben. Durch diese Vereinfachungen können beträchtliche Kosten eingespart werden, da insbesondere die Farbstoff- oder Massenmarkierungen große Kosten verursachen. 30

[0039] Das Verfahren wird vorzugsweise verwendet zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. 35

[0040] Das Verfahren wird besonders bevorzugt verwendet zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

[0041] Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung: 40

45

Beispiel 1

Design und Aufbau genspezifischer und modularer Primer

[0042] Von den Genen OAT (ACCESSION ep30056) und MDR1 (ACCESSION X58723) wurden jeweils die nach einer Bisulfitbehandlung vorliegenden Sequenzen ermittelt. Basierend auf diesen chemisch vorbehandelten DNA-Sequenzen (siehe Anhang) wurden die folgenden genspezifischen Primer-Domänen hergestellt und mit kommerziell erhältlicher Analysesoftware untersucht, um die selbstkomplementären bzw. inter-komplementären Sequenzbereiche in den Primersequenzen auszuschließen (siehe Tab 1 und 2). Diese Sequenzen wurden in nicht-modulare PCR-Primer OAT-fp, OAT-rp, MDR-fp und MDR-rp umgesetzt und in PCR-Reaktionen auf ihre Funktion getestet. Die Primerkombinationen für OAT und MDR1 lieferten bei ihrer Verwendung in PCR-Reaktionen (vgl. Beispiel 2) mit Bisulfit DNA, hergestellt nach publizierter Methode (Olek et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066), die erwarteten Produkte von 479 nt und 633 nt (siehe Tab 1). Als Sequenz für die generischen Primer-Domäne wurden gen1-f, entsprechend der Sequenz des M13 universal. Sequenzierprimers und gen2-f (Tab 2), sowie gen-r entsprechend des reversen M13 Sequenzierprimers ausgewählt. Die entsprechenden, auf diesen Sequenzen basierenden nicht-modularen Primer, zeigten in PCR-Reaktion auf Bisulfit DNA, unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, in den Primerpaarkombinationen gen1-fp, gen-rp, sowie gen2-fp, gen-rp, keine erkennbare PCR-Produkte. 50

55

[0043] Die modularen Primer zur Amplifikation von OAT und MDR1-Genbereichen ergeben sich durch die Fusion der generischen Sequenzen mit den entsprechenden genspezifischen Domänen, um die modularen Primer, OAT-f1mp, OAT-f2mp, OAT-rmp, MDR-f1mp, MDR-f2mp und MDR-rmp zu erhalten (Tab 3). 60

65

DE 100 65 814 A 1

Tab 1. Genspezifische und generische Primerdomäne

Gen	Vorwärts-primer	Revers-primer	PCR-Fragment
5 OAT	OAT-f	OAT-r	479 nt
10 MDR1	MDR-f	MDR-r	633 nt
15 generisch	gen1-f	gen-r	
	gen2-f		

20 Tab 2. Nicht-modulare Primersequenzen

OAT-fp	TTGGAGGTGGATTAGAGGTATAATTAA
OAT-rp	AAACRTCACTACAACCTAAAAACTAA
25 MDR-fp	TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG
30 MDR-rp	TAAAAACTATCCCATAATAACTCCCAAC
gen1-fp	GTAAAACGACGCCAGT
35 gen2-rp	GTAAAACCAGGCCAGT
gen-rp	CAGGAAACAGCTATGAC
40 gen1-fp5	Cy5-GTAAAACGACGCCAGT
gen2-rp5	Cy5-GTAAAACCAGGCCAGT
45 gen-rp5	Cy5-CAGGAAACAGCTATGAC

50 Tab 3. Modulare Primer

Name	Sequenz	generische Domäne	-	genspezifische
55 Domäne				
OAT-f1mp		GTAAAACGACGCCAGT	-TTGGAGGTGGATTAGAGGTATAATTAA	

60

65

OAT-f2mp GTAAAACCAGGCCAGT-TTGGAGGTGGATTAGAGGTATAATTAA
 OAT-rmp CAGGAAACAGCTATGAC-AAACRTCACTACAACTAAAAACTAA

5

MDR-f1mp GTAAAACGACGCCAGT-TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG
 MDR-f2mp GTAAAACCAGGCCAGT-TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG
 MDR-rmp CAGGAAACAGCTATGAC-TAAAAACTATCCCATAATAACTCCCAAC

10

15

Beispiel 2

Gen-spezifische Amplifikation von OAT und MDR1 mit modularen Primern

20

[0044] Die Amplifikation von OAT- und MDR1-Genbereichen erfolgte mit Qiagen Hotstart-Polymerase entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

Reaktionsansatz (allgemein)

25

Bisulphit-DNA (10 ng)	1 µl
Reaktions-Puffer 10x (Qiagen, Hilden)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM each)	2 µl
Primer1 6,25 pmol	2 µl
Primer2 6,25 pmol	2 µl
Polymerase (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,5 µl
Wasser	11,5 µl

30

[0045] Die PCR-Reaktion wurde im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgendem Programm durchgeführt.

Programm

15 min 96 °C

40

60 s 96 °C

30 s 56-60 °C

45 s 72 °C

x 40

45

10 min 72 °C

50

[0046] In Tab 4 sind die verwendeten Primerkombinationen und Annealing-Temperaturen für die Amplifikation von OAT und MDR1 zusammengefaßt. Die erzeugten PCR-Amplifikate wurden durch Agarosegel-Elektrophorese (1,5% Agarose in 0,5 × TBE-Puffer, Manniatis et al.) analysiert. Hierfür wurden 4 µl des PCR-Ansatzes der Gelelektrophorese unterzogen, das Ergebnis ist in Abb 1 dargestellt.

55

60

65

Tab. 4 PCR-Primerkombinationen

Gen	Primer 1	Primer 2	Annealing Temp.	Spur in Abb 1	
5	OAT	OAT-f1mp	OAT-rmp	55,6 °C	A
10	OAT	OAT-f2mp	OAT-rmp	55,6 °C	B
15	MDR1	MDR-f1mp	MDR-rmp	59 °C	C
20	MDR1	MDR-f2mp	MDR-rmp	59 °C	D

Beispiel 3

Reamplifikation von OAT und MDR1 mit generischen Primern

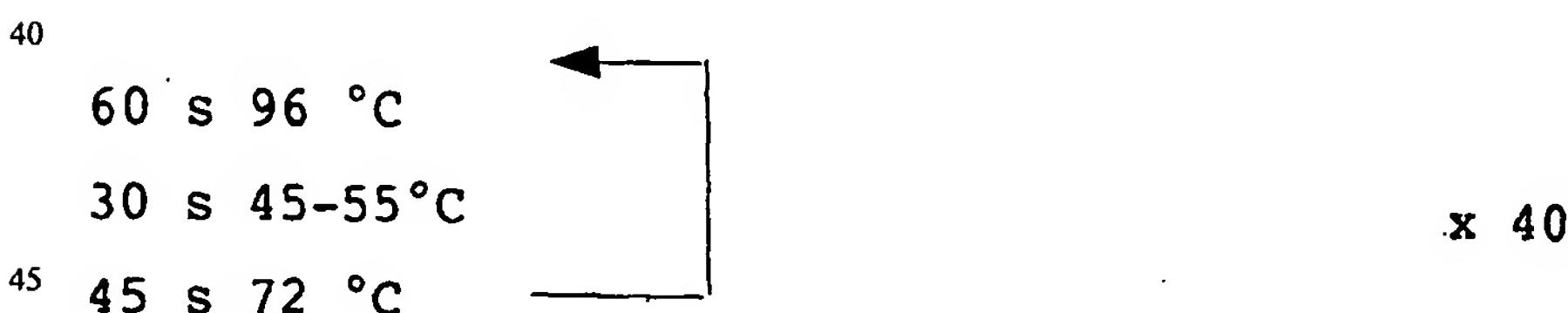
[0047] Für die Reamplifikation (= Markierungsamplifikation) von OAT- und MDR1-Genbereichen erfolgte mit Qiagen Hotstart-Polymerase entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Hierbei wurden die PCR-Produkte aus der Genspezifischen PCR (siehe Beispiel 2, Abb 1) 1 : 1000 verdünnt und getrennt oder gemeinsam in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Als Primer wurden die am 3'-Ende mit dem Floureszenzfarbstoff, Cy5, modifizierte Primerpaare gen1-fp5 und gen-rp5, sowie gen2-fp5 und gen-rp5 verwendet: Die Ergebnisse dieser Markierungsamplifikation sind in Abb. 2 dargestellt.

Reaktionsansatz (allgemein)

Templat-DNA	1 µl
Reaktionspuffer 14x (Qiagen, Hilden)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM each)	2 µl
30 Primerpaar (6,25 pmol je Primer)	4 µl
Polymerase (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,5 µl
Wasser	11,5 µl

[0048] Die PCR-Reaktion wurde im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgendem Program durchgeführt:

15 min 96 °C



50 10 min 72 °C

[0049] Die erzeugten PCR-Amplifikate wurden durch Agarosegel-Elektrophorese (1,5% Agarose in 0,5 × TBE-Puffer, Manniatis et al.) analysiert. Hierfür wurden 4 µl des PCR-Ansatzes der Gelelektrophorese unterzogen, das Ergebnis ist in Abb 2 dargestellt. Unter den angegebenen Bedingungen konnten sowohl OAT und MDR1, mit beiden generischen Primerpaaren erfolgreich amplifiziert und somit in einer PCR-Reaktion gleichzeitig, identisch modifiziert werden.

55 Kurzbeschreibung der Figuren

Fig. 1

60 Genspezifische Amplifikation von OAT und MDR1.

[0050] M Größenmarker, A, Amplifikation von OAT (Primer: OAT-f1mp und OAT-rmp), B, Amplifikation von OAT (Primer: OAT-f2mp und OAT-rmp), C, Amplifikation von MDR1 (Primer: MDR-f1mp und MDR-rmp) und D, Amplifikation von MDR1 (Primer: MDR-f2mp und MDR-rmp)

Fig. 2

Reamplifikation von OAT/Mdr1-Fragmenten aus Beispiel 2 mit generischen Primer

[0051] M Größenmarker, A, MDR1 mit Primer gen1-fp5 und gen-rp; B, OAT mit Primer gen1-fp5 und gen-rp; C, 5 MDR1 und OAT mit Primer gen1-fp5 und gen-rp; D, MDR1 und OAT mit Primer gen2-fp5 und gen-rp.

Anhang

Sequenzen von OAT und MDR1 nach der Behandlung mit Bisulfit

10

MDR1

0	GTAAAGAATA AAATATATTA AGATAAGGAA AATTGTAGT TAAGAATAGA AAAAAATTAT	15
60	GGTTTGAAG TATGAGTTAT TTAAAGAAAG TGGAAATATT TTTAGATTAT GTAGTAAAAA	
120	ATAAAGTGAT TTTTTTTTTT TAAATTATG TAATAAATTG ATAGGTAATA TGTGAAAGTT	
180	ATAGAATGTA GATTAGAGGA TATAATAAAT TTATTTTTT TATGTTATA AGAAGTAAGA	20
240	AAAGTTTGA TGTGAGTTAG TATTGTTTA TAATTTGAA TTGTGAGAT TGTACGTATT	
300	TTTTTTAGT TTGAAGTAAA TAGTGGATAG GAAAAAATAT TAAATGTTGG TAGTAAATAT	
360	GGAAGGAAAT TATAATTAAT GTAATATGTT AAAATATGTT ATGTTTATTT TATTAATTG	25
420	AATTAAAATG TAAGAATTAA AAATGTTTG GAAAAATACG CGTATTGATT TGACGTTGA	
480	AGTTTTAAAA TATTATATAT TTTGAAATAG TATTGTTATT TTGAAATATT TGTGTTTATA	
540	TATTTTTAA AATTTTTTTT TTTTTTTATT TTATTATTA TTAAATAAAG GATGAATAGA	30
600	TGTAATTAG AAATTGTTAA GTATGTTGAA GAAAGATTAT TGTAGAAAAA TTTTTTTAG	
660	TTTTTTAAA GGTGTTAGGA AGTAGAAAGG TGATATAGAA TTGGAGAGGT CGGAGTTTT	
720	GTATTAAATTG TATTAAATGC GAATTTCGAG AAAATTTTTT TTAATTACGT TTTGTTAGTTA	35
780	TATGGATATG AAGATTTATG TGAATTTGA AAGACGTGTT TATATAAGTT GAAATGTTT	
840	TAATGATTAA GTGATGCGC GTTTTTTAT TTGTTTTTT TAGAGAGGTG TAACGGAAGT	
900	TAGAATATTT TTTTGAAA TTTAATTGT TTCGTAGTTT TTCGAGGAAT TAGTATTAG	40
960	TTAATTGGGG TCGGGAGTAG TTATTTGTGG TGAGGTTGAT TGGTGGGTA GGAATAGCGT	
1020	CGGGCGTGG GTTGAGTATA GTCGTTACGT TTTTTTTGTT ATAGGAAGTT TGAGTTTATT	
1080	CGAGTAGCGG TTTTTTAAG TTTAAAGAAG TAGAGGTCGT TGTCGTTTT TTTAGGTTT	45
1140	TTTTATTAAA GTCGGAGTAT TTTTTTTAA AATTTACGT TTTGGTGGTC GTTTTAAGGA	
1200	GCGCGAGGTA GGGGTACGTA AAGTTGGGAG TTATTATGGG ATAGTTTTA AGTGTAGGT	50
1260	TTTTAGATTT TTTGAATTG GTTTTACGG GAGAAGGGTT TTTGAGGCG TGGATAGTGT	
1320	GAAGTTTTT GGTAAAGTTA TGGGGATTAA GTGGGGTAG ATTAGATTAGTT AGGAGTTTT	
1380	GGAGTAGCGT TTAAATCGTA GTGGTATTGG ATTATGTTGT TCGGAGCGCG TATAGTTCGC	55
1440	GCGGTGCGGG GATTTGTTTT TTGAGTTCGC GGGCGTGGG TGGGAGGAAG TATCGTTCGC	
1500	GGCGATTGGA ATCGGGAGGG AGAACGTAT TGGCGCGGG TAAAGTTAG AACCGTTGT	
1560	TAGATTTTA ATTGTTTTT CGTGGAGATG TTGGAGATT CGCGTATAGG AAAGTTTTG	60
1620	TAGTGTAT CGCGGTTAGA GTAGTTGGGG TATTAACGGC GGGCGTTTT TTTTATTGTT	
1680	TTTGTTTC GACGGGGGAT TAGAGGTTAG TTTTATTGTT AGCGCGTTG AGGTTTATGT	
1740	ATTGTTAA TGAGTTGCGG TTTTTTTA GGTGGGATG GATTTGAAG GGGATCGTAA	65
1800	TGGAGGAGTA AAGAAGAAGA ATTGTTAA ATTGAATAAT AAAAGGTAAT TAGTTGTTT	

1860 TATTTTTATA GTTTATATAG TTGCGAGATT TGAGTAATT ATTGTTAGTT TTTAGTTTG
 1920 AAATAAAATGA TATGTTGTTG TTTTTAATTA TTTTTAAGAA ACGTAAGTTA GTTTTTGGAA
 5 1980 TTAATATTTT TGTTTAGAGT AGAAGTTGT TGTTGAGTG GAGTATAGTA TATGTATTTT
 2040 TTTTGTTTTT TTTGTTTTTT TTTTTAATGA TATATAATAT TTTATATATT TATGAAATGG
 2100 GGTATATGGA AGCGTTTTT ATATGTCGG AATGTGTAAT GATTAAGPTC GGGTATTGAA
 10 2160 AGGATATATT ATTGTTAGGTA TATTTTATT TTATGTTGTTG ATAATATTTT AAGTTTTTA
 2220 GTTATTTGA AATATATAAT ATATTGTTAA TTGTTAGTTAT TTTCGTTGT TATCGAATAT
 2280 TGGAATTAT TTGTTTTATT TAATCGTTT TAGTTATTTA TTAATTTTT TTTATTTAT
 15 2340 TTTTTTATT TTTTCGGTTT TTTTTTTTA GTTTGGTGT GTTTTTTTT TAGTTTTTT
 2400 GTTTAGATA GGCGGATGTT TATATGTT TTTGTTTAT GAATTTTGT TTTTTAAGTG
 20 2460 GTGTTGGTCG TTTATACGTG AGTTATATGT TGTTGGTGAT TTGTTTTGTG GTTTAGGTTT
 2520 TTGTTTCGG TAAATGGTTA TGAAATATC GCGTTGTGG TTGTTTGAT GAGATAGAAG
 2580 GTTAAAAGTA TATTTAGGTT GTTAATTGGT AATAAATATT TGTATATAAT ATTGGTAATG
 2640 TAATTATATA GGGAAAATAA TTATTTAAAG TAAATTTGA TTATGGTGT TTGTTTTAT
 2700 AGAATATTTA AAATTTTATT AAATAGATT ATTGTTAGTA GTAAATTGTA AAATAGATTA
 2760 GTAAGTTAA TAATATTAGA AATTGTAATG TAAATTATAA GATAAATTAG TTAAATATAT
 30 2820 TAATATTATA AGAAATTAAG TTTTTAGTG TAAGAGAAAA AATATAAATG TGGAAATTAA
 2880 ATATATTTT AAAAATAATG TTAAGTTGA ATTAGAAATT TPAATATGAA TT

35 OAT

1 GGTAGCGACG ATTGTTGGAG GTGGATTTAG AGGTATAATT AAGTCGCGCG GCGTATTAGG
 61 GTTTAAGGGT ATGGGGTTT CGTAGTTGTG GTTGGGGTAG AGTTGGGGTT GTTTTTTTT
 40 121 TTAGGAGTAT AGGC GGCGGT TTAGTTTAC GTTTTCGTT TTAGTTATA TTGGTTTCGC
 181 GTAGTGGGGG GTTTAATAGA TTTTTTTTT TCGGGTTTA GTTTTTCGT TAGTAAGGGC
 241 GGATAAGGAT TTTTTTCGTT TCGTTAGAGG AGGCGATCGA GGGGTTTGAG TTTAGGTATA
 45 301 GGTGGCGGG TTTAGGAGGC GCGAGGCGGA TCGAATTGCG GGGAGGAGTA AAGATTTTG
 361 ATGCGCGGTC GGAGGGCGGG GCGGAGGACG GGATTTACGC GATTGGTATT TTGTTTTCG
 421 TTTAGTTAA TGAGCGGCAGA GGGTGTGTTG GGGGCGGGGT AGAATTAGTT TTAAAGTTGT
 50 481 AGTGACGTTT CGGC GTTATT GTTGC GTTATT ATAGACGTCG CGTGTATTG GTTGTGTTA
 541 GGC GTTGTGTTA GGTATCGTTT GGGCGTCGTT GTTTGGGGT TTGGTTCGG GTTGTGTCGG
 55 601 AACRTCACT ACAACTAAA AACTAA

Patentansprüche

60 1. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, **dadurch gekennzeichnet**, dass die folgenden Schritte ausgeführt werden:
 a) die zu amplifizierenden Abschnitte werden mit mindestens zwei Primeroligonukleotiden hybridisiert, welche zwei Domänen aufweisen, von denen die am 3'-Ende befindliche, sequenzspezifische Domäne an den zu amplifizierenden Abschnitt hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche, generische Domäne nicht hybridisiert,
 b) es wird eine erste Amplifikationsreaktion mittels einer Polymerase durchgeführt,
 c) an die Amplifikate wird ein markiertes Primeroligonukleotid hybridisiert, welches an die generische Domäne der ersten Primer hybridisiert und
 d) das Amplifikat hinsichtlich seiner Sequenz untersucht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass nach Schritt c) des Anspruchs 1 zusätzlich eine zweite Amplifikation mit einer Polymerasereaktion erfolgt. 5

3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die generische Domäne der Primer die Nukleobasen A, C, G und T enthält, während die sequenzspezifische Domäne entweder nur die Basen A, T und C oder aber nur die Basen A, T und G enthält. 10

4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man vor Schritt a) des Anspruchs 1 die Nukleinsäureprobe mit einem Reagenz chemisch umsetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. 15

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Reagenz um ein Bisulfit (= Hydrogensulfit, Disulfit) handelt. 10

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt. 15

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist. 20

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Markierungen der Oligonukleotidprimer um Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichem Emissionsspektrum (z. B. Cy3, Cy5, FAM, HEX, TET oder ROX) oder um Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen im Falle von Energietransfer-Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern handelt. 25

9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind. 20

10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. 25

11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Markierung Moleküle verwendet werden, die erst in einer weiteren chemischen Reaktion ein Signal erzeugen. 30

12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Markierung Moleküle verwendet werden, die an definierten Stellen an einer Festphase immobilisiert werden. 30

13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die PCR-Fragmente auf einer Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind. 35

14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind. 35

15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird. 40

16. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäure aus einer genetischen DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen. 45

17. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. 50

18. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung. 55

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

55

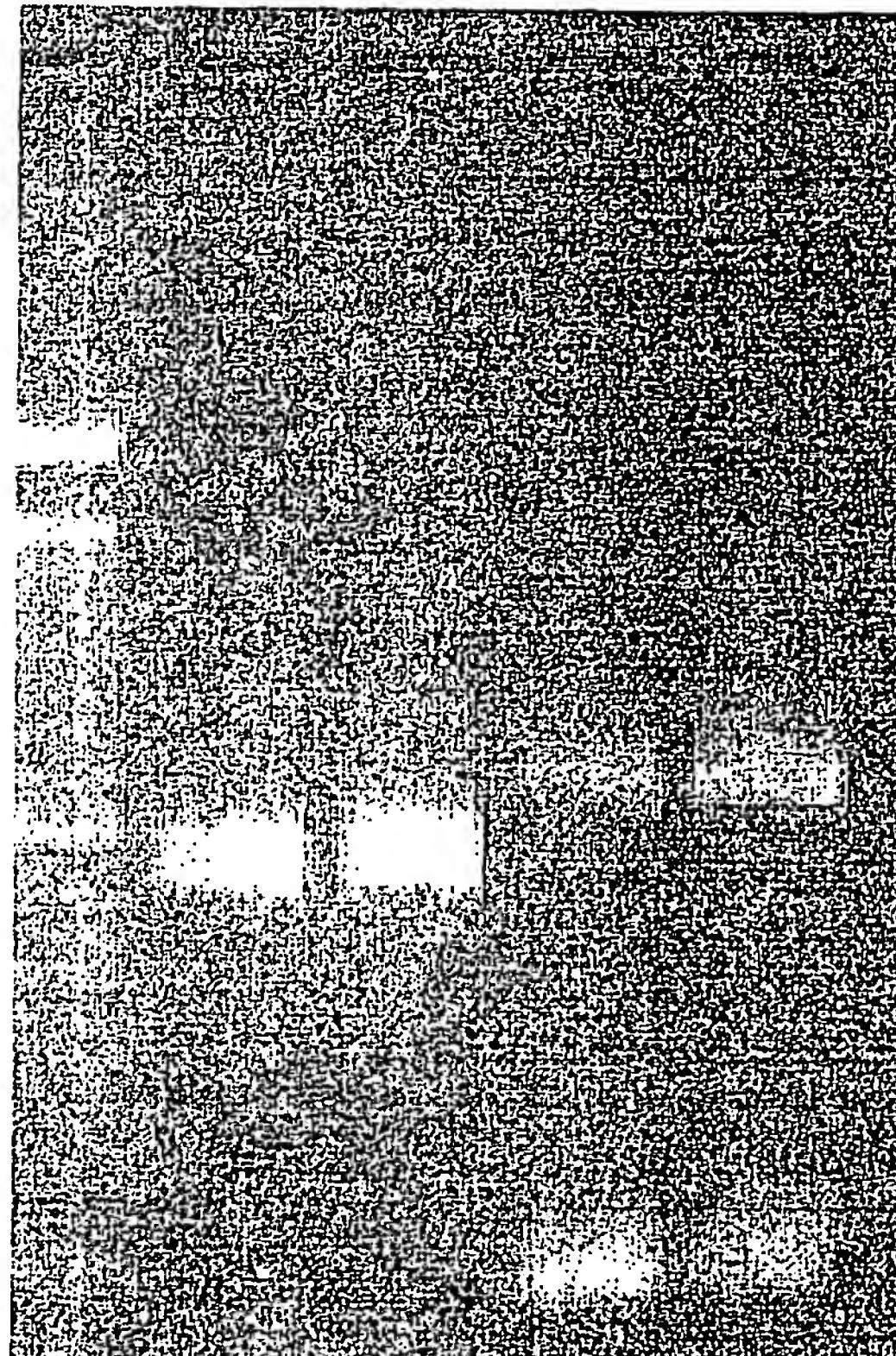
60

65

- Leerseite -

Figur 1

M A B C D



Figur 2

